



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111303** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2016 03768</p> <p>(22) Дата подання заявки: 08.04.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.11.2016</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.11.2016, Бюл.№ 21</p>	<p>(72) Винахідник(и): Коваль Галина Данилівна (UA), Чоп'як Валентина Володимирівна (UA), Юзько Олександр Михайлович (UA), Краснов Володимир Володимирович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ", пл. Театральна, 2, м. Чернівці, 58002 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ БЕЗПЛІДДЯ У ЖІНОК, ХВОРИХ НА ЕНДОМЕТРІОЗ, НА ОСНОВІ ВИЗНАЧЕННЯ ІМУННИХ МАРКЕРІВ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування результативності лікування безпліддя у жінок, хворих на ендометріоз, на основі визначення імунних маркерів шляхом визначення рівня ІЛ-10 його інформативності та бального прогнозування ефективності лікування безпліддя у жінок. Визначають імунні маркери, а саме: рівні експресії мРНК T-bet, GATA-3, Foxp3, TLR2, TLR4 в тканині ендометрія методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі та ІЛ-2, ІНФ- γ , ІЛ-4, ІЛ-10, TNF- α імуноферментним методом у сироватці крові, визначають значимість у балах прогнозування результатів консервативного лікування безпліддя, потім обчислюють суму балів для пацієнтки та визначають імовірність настання вагітності (у %) для консервативного лікування безпліддя.

UA 111303 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до гінекології та клінічної імунології, і може бути використана для підвищення точності прогнозування результативності лікування безпліддя у жінок з ендометріозом.

Результативність лікування безпліддя при ендометріозі залишається на рівні невисоких результатів (до 30 % за даними різних джерел) і, часто, мрія жінки, хворої на ендометріоз, про дитину так і залишається нездійсненою. Окрім того, намагання різними способами перебороти проблему бездітності при ендометріозі змушує жінок шукати різноманітні, часто, неефективні способи подолання цієї проблеми, що тягне за собою витрачання великих коштів та часу [Юзько О.М. Застосування допоміжних репродуктивних технологій при лікуванні безпліддя в Україні / О.М. Юзько, Т.А. Юзько // Жіночий лікар. - 2010. - № 2 (28). - С. 30-34].

Лікування безпліддя у жінок з ендометріозом включає використання ендокірургічного лікування (видалення ендометріюїдних вогнищ) з наступним розходженням лікувальних маршрутів жінок на два основних підходи: консервативне ведення з призначенням гормональних препаратів та очікуванням настання природної вагітності або використання допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). ДРТ включають інсемінацію спермою чоловіка, екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ), інтрацитоплазматичне введення сперматозоїда (Intra Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI), донорство ооцитів. Вибір тактики і підходів до лікування безпліддя при ендометріозі базується на результатах комплексного клініко-лабораторного дослідження. Тим не менш, можливості обґрунтування вибору лікувального маршруту (консервативного лікування або необхідності застосування ДРТ) у конкретної жінки, на даний момент, обмежені. Це часто призводить до тривалого неефективного консервативного лікування, що тягне за собою необґрунтовані витрати і втрату часу і, з іншого боку, - до застосування ДРТ в тих ситуаціях, коли можна отримати вагітність природним шляхом. Очевидно, досягнення вищої результативності лікування безпліддя у хворих на ендометріоз можливе шляхом вибору правильного лікувального маршруту, оснований на прогнозуванні підсумків того чи іншого підходу до лікування. На наш погляд, на кінцевий результат того чи іншого виду лікування безпліддя при ендометріозі можуть мати вплив імуногенетичні та імунологічні фактори патогенезу захворювання, тому було доцільним провести прогнозування результативності лікування на підставі імунологічних показників.

Найближчим аналогом є спосіб прогнозування ефективності допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) у пацієнток з безпліддям, яке обумовлене хронічними запальними захворюваннями органів малого таза (Патент № 54908, Україна, 08.06.2010, опублік. 25.11.2010, бюл. № 22), в якому визначають вік пацієнток, термін безпліддя, абсолютну кількість бластоцист, абсолютну та процентну кількість ембріонів 1-го та 3-го класу, в сироватці крові вміст $CD16^+56^+CD3^+$, $CD4^+CD25^+$, $CD3^+$, ІЛ-10, а в фолікулярній рідині вміст $HLA-DR^+$, $HLA-DR^+CD3^+$, $HLA-DR^+CD3^+$, $CD16^+56^+CD3^+$, $CD16^+56^+$, $CD4^+$, ІФН γ , ІЛ-10 та ІЛ-6 з наступним визначенням прогностичних коефіцієнтів (ПК) кожного із вимірів та його інформативності, при інформативності ознаки 1,0 і більше одержані значення коефіцієнтів підсумовують і, якщо сума складає 13,0 та більше із знаком "плюс", ДРТ прогнозують як ефективну, а якщо із знаком "мінус" - як неефективну, у випадку, якщо при підсумовуванні усіх ПК прогностичний поріг (13,0) не досягнутий - прогноз оцінюють як невизначений.

Недоліком способу-аналога є те, що прогнозування здійснюється лише відносно одного виду лікування з використанням допоміжних репродуктивних технологій. При відсутності прогнозування ймовірності самостійної вагітності після консервативного лікування.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб прогнозування результативності лікування безпліддя у жінок, хворих на ендометріоз шляхом визначення імунних маркерів, а саме: рівнів експресії мРНК T-bet, GATA-3, Foxp3, TLR2, TLR4 в тканині ендометрія методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі та ІЛ-2, ІНФ- γ , ІЛ-4, ІЛ-10, TNF- α імуноферментним методом у сироватці крові з наступним бальним прогнозуванням на основі визначення інформативності діапазонів значень кожного показника.

Спільними ознаками аналога та корисної моделі є визначення рівня ІЛ-10 його інформативності та бального прогнозування ефективності лікування безпліддя у жінок.

Відмінності корисної моделі від аналога представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння корисної моделі та найближчого аналога за ознаками

Ознаки	Корисна модель	Найближчий аналог
Визначення рівнів цитокінів	IL-2, INF- γ , IL-4, IL-10, TNF- α у сироватці крові	IL-10, IL-6 у фолікулярній рідині
Визначення імунних маркерів	T-bet, GATA-3, T-bet/GATA-3, Foxp3, TLR2, TLR4 в тканині ендометрія	HLA-DR ⁺ , HLA-DR ⁺ CD3 ⁺ , HLA-DR ⁺ CD3 ⁺ , CD16 ⁺ 56 ⁺ CD3 ⁺ , CD16 ⁺ 56 ⁺ , CD4 ⁺ в сироватці крові та фолікулярній рідині
Прогнозування результативності лікування безпліддя	Консервативного лікування безпліддя та ДРТ на основі бального прогнозування суми інформативності імунних маркерів	ДРТ на основі бального прогнозування суми інформативності імунних маркерів

Визначення термінів, які використовуються при описі корисної моделі: ендометріоз, безпліддя, допоміжні репродуктивні технології, імунні клітини, IL-2, TNF- γ , IL-4, IL-10, TNF- α , T-bet, GATA-3, Tbet/GATA-3, Foxp3, TLR2, TLR4, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі.

Теоретичні передумови здійснення способу

Загальноновизнано, що розвиток такого захворювання, як ендометріоз відбувається на тлі імунологічного дисбалансу. Доказами цього твердження є результати багатьох наукових робіт, котрі демонструють суттєві зміни на рівні вроджених та набутих імунологічних механізмів. Не викликає сумніву й роль порушень імунологічної регуляції у формуванні безпліддя асоційованого з ендометріозом. Однак, глибина та патологічна вісь порушень імунологічних взаємозв'язків при ендометріозі достеменно не з'ясовані більшість наукових робіт констатують факти тих чи інших змін на рівні локального чи системного імунітету, без виявлення природи цих порушень та типу імунної відповіді при ендометріозі. На нашу думку, визначальними факторами розвитку імунної відповіді при ендометріозі, у тому чи іншому напрямку, є імуногенетичні, молекулярні фактори. Зокрема, важливим і невирішеним питанням патогенезу ендометріозу є порушення парадигми Th1/Th2 клітин. Доказами порушень співвідношення Th1/Th2 клітин є дуже багато робіт, які демонструють порушення балансу цитокінів Th1/Th2 у хворих з ендометріозом [Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis /Y.S. Antsiferova, N.Y.Sotnikova, L.V. Posiseeva [et al.] // Fertility and sterility. -2005. -Vol. 84. -P.1705-1711]. Зокрема, встановлено, що при ендометріозі в перитонеальній рідині зростає кількість типових Th1 цитокінів - 1NF- γ та IL-2 та типового Th2 цитокіну - IL-4 [Interleukin-4 Stimulates Proliferation of Endometriotic Stromal Cells / Z.O. Yang, Y. Hirota, Y. Osuga [et al.] // Am J Pathol. -2008. -Vol. 173, №2. -P. 463-469; Interleukin-6 and tumor necrosis factor α -mediated expression of hepatocyte growth factor by stromal cells and its involvement in the growth of endometriosis / K.N. Khan, H. Masuzaki, A. Fujishita [et al.] // Hum Reprod. -2005. -№ 20. -P. 2715-2723]. Однак, чи являється ендометріоз Th1 - чи Th2-опосередкованим захворюванням достеменно не зрозуміло, адже типові Th1 - чи Th2 цитокіни, також, можуть продукуватися іншими типами клітин і на сучасному етапі така оцінка здійснюється шляхом визначення відповідних транскрипційних факторів регуляції диференціювання імунних клітин (T-bet та GATA-3 відповідно) та їх співвідношення, тобто T-bet/GATA-3 [Coomes S. M. Plasticity within the $\alpha\beta^+$ CD4⁺T-cell lineage: when, how and what for? [Електронний ресурс] / S. M. Coomes, V.S. Pelly and M.S. Wilson //Open Biology/ - 2013. -№ 3. -P.3-12]. І, власне, вираження цих транскрипційних факторів має великий вплив на загальний характер імунної відповіді та синтезу цитокінів, зокрема.

Залежність розвитку безпліддя та й успіху його лікування від показника експресії транскрипційного фактора регуляторних клітин - Foxp3 стало предметом активного вивчення в усьому світі з доведенням ключової ролі цих клітин в толерантності до плодових антигенів, тобто можливості вагітності [Berbic M. The role of Foxp3+regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition / M.Berbic, A.J. Hey-

Cunningham, C Ng, N.Tokushige, S.Ganewatta, R. Markham // Hum Reprod. - 2010. - № 25. - P. 900-907].

- Останнім часом, до ролі TLR2 і TLR4 в проблемах безпліддя прикута пильна увага. Зокрема, рядом досліджень показано, що репродуктивні втрати асоціюються з підвищенням рівнів TLR2 і TLR4, що пов'язано з можливими інфекційними антигенами [Khan K.N. Toll-like receptor system and endometriosis. / K.N.Khan, M. Kitajima, A. Fujishita et al. // J. Obstet. Gynaecol. Res. - 2013.- Vol. 39. -N 8. -P.1281-1292].

Спосіб здійснюють наступним чином.

- У жінок, хворих на ендометріоз, асоційований із безпліддям, визначають імунні маркери, а саме: рівні експресії мРНК T-bet, GATA-3, Foxp3, TLR2, TLR4 в тканині ендометрія методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі та IL-2, INF- γ , IL-4, IL-10 імуноферментним методом у сироватці крові. За допомогою таблиць 2 та 3 визначають значимість у балах прогнозування результатів консервативного лікування безпліддя та ДРТ.

Таблиця 2

Значимість імунних маркерів для прогнозування результату консервативного лікування безпліддя у жінок, хворих на ендометріоз

Коефіцієнт маркера	Показник	Значення показника	Значимість (бали)
x ₁	TLR2	0,89-2,26 мРНК	2,66
x ₂	Foxp3	0,54-1,13 мРНК	1,81
x ₃	IL-2	0,6-3,4 пг/мл	1,33
x ₄	TLR4	1,01-1,98 мРНК	1,2
x ₅	INF- γ	51,5-73,5 пг/мл	1,14
x ₆	GATA-3	0,67-1,67 мРНК	1,09
x ₇	T-bet/GATA-3	1,64-5,15	1,02

Таблиця 3

Значимість імунних маркерів для прогнозування результату ДРТ у жінок, хворих на ендометріоз

Коефіцієнт ознаки	Показник	Значення показника; (інтервал)**	Значимість (бали)
x ₁	T-bet/GATA-3	1,64-5,15	2,23
x ₂	IL-4	1,94-2,51 пг/мл	2,12
x ₃	GATA-3	1,68-2,22 мРНК	1,26
x ₄	TLR2	1,12-8,43 мРНК	1,26
x ₅	TLR4	1,01-1,98 мРНК	1,25
x ₆	TNF- α	1,9-5,6 пг/мл	1,11
x ₇	IL-10	81-132 пг/мл	1,1
x ₈	Foxp3	0,54-1,12 мРНК	1,04

Обчислюють суму балів для пацієнтки та за таблицями 4 та 5 визначають імовірність настання вагітності (у %) для консервативного лікування безпліддя та ДРТ.

Таблиця 4

Імовірність настання вагітності у жінок, хворих на ендометріозом, після консервативного лікування

Сума балів	Імовірність настання вагітності (%)
<1,14	0
1,15-3,74	30
3,75-5,55	50
5,56-6,69	70
6,70-8,14	90
>8,15	>90

Таблиця 5

Імовірність настання вагітності у жінок, хворих на ендометріозом, після ДРТ

Сума балів	Імовірність настання вагітності (%)
<1,25	0
1,26-2,35	30
2,36-3,15	50
3,16-4,35	70
4,36-6,49	90
>6,50	>90

За більшим показником імовірності настання вагітності прогнозують більшу результативність лікування.

Приклад використання корисної моделі.

5 Приклад 1.

Жінка М., 34 роки. Отримано значення імунних маркерів: мРНК T-bet - 2,15; мРНК GATA-3 - 2,10; T-bet/GATA-3 - 1,02; мРНК Foxp3 - 0,44; мРНК TLR2 - 5,45; мРНК TLR4 - 4,12; IL-2 - 2,5 пг/мл, INF-γ - 51,2 пг/мл; IL-4 - 4,54 пг/мл, IL-10 - 87 пг/мл; TNF-α - 4,2 пг/мл. Сума балів за таблицею 2 складає 6,39 бала, за таблицею 3-7,99 бала. Прогнозується імовірність настання вагітності після консервативного лікування 70 % та після ДРТ більше 90 %.

10 Приклад 2.

Жінка А., 29 років. Отримано значення імунних маркерів: мРНК T-bet - 3,11; мРНК GATA-3 - 1,15; T-bet/GATA-3 - 2,71; мРНК Foxp3 - 0,35; мРНК TLR2 - 3,12; мРНК TLR4 - 2,15; IL-2 - 2,7 пг/мл, INF-γ - 58,5 пг/мл; IL-4 - 3,51 пг/мл, IL-10 - 144 пг/мл; TNF-α - 15,5 пг/мл. Сума балів за таблицею 2 складає 2,47 бала, за таблицею 3-6,00 бала. Прогнозується імовірність настання вагітності після консервативного лікування 30 % та після ДРТ - 90 %.

Технічний результат. Запропонований спосіб дозволяє ефективно прогнозувати результативність лікування безпліддя у жінок, хворих на ендометріоз, шляхом визначення імунних маркерів.

20 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування результативності лікування безпліддя у жінок, хворих на ендометріоз, на основі визначення імунних маркерів шляхом визначення рівня IL-10 його інформативності та
 25 бального прогнозування ефективності лікування безпліддя у жінок, який **відрізняється** тим, що визначають імунні маркери, а саме: рівні експресії мРНК T-bet, GATA-3, Foxp3, TLR2, TLR4 в тканині ендометрія методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі та IL-2, INF-γ, IL-4, IL-10, TNF-α імуноферментним методом у сироватці крові; визначають значимість у балах прогнозування результатів консервативного лікування безпліддя: при значеннях TLR2 0,89-2,26 мРНК - значимість складає 2,66 бала, при значеннях Foxp3 0,54-1,13 мРНК - 1,81 бала, при значеннях IL-2 0,6-3,4 пг/мл - 1,33 бала, при значеннях TLR4 1,01-1,98 мРНК - 1,2 бала, при значеннях INF-γ 51,5-73,5 пг/мл - 1,14 бала, при значеннях GATA-3 0,67-1,67 мРНК - 1,09 бала, при значеннях T-bet/GATA-3 1,64-5,15 - 1,02, та ДРТ: при значеннях T-bet/GATA-3 1,64-5,15 - 2,23 бала, при значеннях IL-4 1,94-2,51 пг/мл - 2,12 бала, при значеннях GATA-3 1,68-2,22 мРНК
 30 - 1,26 бала, при значеннях TLR2 1,12-8,43 мРНК - 1,26 бала, при значеннях TLR4 1,01-1,98 мРНК -1,25 бала, при значеннях TNF-α 1,9-5,6 пг/мл - 1,11, при значеннях IL-10 81-132 пг/мл - 1,1 бала, при значеннях Foxp3 0,54-1,12 мРНК - 1,04; потім обчислюють суму балів для пацієнтки та визначають імовірність настання вагітності (у %) для консервативного лікування безпліддя: при сумі балів до 1,14 імовірність настання вагітності становить близько 0 %; від 1,15 до 3,74 - 30 %; від 3,75 до 5,55 - 50 %; від 5,56 до 6,69 - 70 %; від 6,70 до 8,14 - 90 %; більше 8,15 - більше 90 %, та ДРТ: при сумі балів до 1,25 імовірність настання вагітності становить близько 0 %; від 1,26 до 2,35 - 30 %; від 2,36 до 3,15 - 50 %; від 3,16 до 4,35 - 70 %; від 4,36 до 6,49 - 90 %; більше 6,50 - більше 90 %.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601